Dosage de la chitine sur des ectomycorhizes de pin maritime (*Pinus pinaster*) à *Pisolithus tinctorius*: évaluation de la masse mycélienne et de la mycorhization

CLAUDE PLASSARD, DANIEL MOUSAIN ET LOUIS SALSAC
Laboratoire de Recherches sur les Symbiotes des Racines, Institut National de la Recherche Agronomique, 9, Place Viala, 34060 Montpellier Cédex, France

Reçu le 15 juin 1982

PLASSARD, C., D. MOUSAIN et L. SALSAC. 1983. Dosage de la chitine sur des ectomycorhizes de pin maritime (*Pinus pinaster*) à *Pisolithus tinctorius*: évaluation de la masse mycélienne et de la mycorhization. Can. J. Bot. **61**: 692–699.

Pour évaluer l'intensité de la mycorhization du pin maritime (*Pinus pinaster* Soland. *in* Ait.) associé avec le *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker et Couch., deux méthodes ont été utilisées: le dosage de la chitine fongique après hydrolyse alcaline ou acide; la mesure d'absorbance des pigments du champignon extraits par l'acétone. Les produits d'hydrolyse de la chitine sont dosés par colorimétrie. L'hydrolyse alcaline permet de doser directement le chitosane fongique; après hydrolyse acide les tissus du pin fournissent des composés sensibles à la réaction colorée et l'absorbance due à la chitine est estimée à partir de l'absorbance totale de l'hydrolysat. De bonnes corrélations existent entre ces différents types de détermination entre eux et le comptage des mycorhizes.

PLASSARD, C., D. MOUSAIN, and L. SALSAC. 1983. Dosage de la chitine sur des ectomycorhizes de pin maritime (*Pinus pinaster*) à *Pisolithus tinctorius*: évaluation de la masse mycélienne et de la mycorhization. Can. J. Bot. **61**: 692–699.

To estimate the intensity of mycorrhizal development of maritime pine (*Pinus pinaster* Soland. *in* Ait.) associated with *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker et Couch., two methods were used: the assay of fungal chitin after acid or alkaline hydrolysis; the measure of absorption of fungus pigments extracted by means of acetone. The products of the hydrolysis of the chitin are assayed by a colorimetric method. The alkaline hydrolysis enables us to directly assay the fungal chitosan; after acid hydrolysis the tissues of pine produce some substances reacting colorimetrically and the absorption due to chitin is estimated from the total absorption of the hydrolysate. There are good correlations between these different types of determination themselves and between the determination and the counting of the mycorrhizae.

Introduction

Dans les expériences de mycorhization contrôlée, la mesure de l'intensité d'infection est souvent nécessaire: le degré de mycorhization peut être évalué par comptage des mycorhizes, soit directement pour les ectomycorhizes, soit après coupe et coloration chez les endomycorhizes (6, 1, 4, 2). Ces comptages sont fastidieux et leur résultat souvent subjectif. La mesure du degré d'infection des racines par le dosage colorimétrique des produits d'hydrolyse de la chitine fongique constitue une alternative aux méthodes précédentes. Ce dosage quantitatif a déjà été utilisé pour estimer le degré d'endomycorhization de plusieurs plantes (1, 5, 7).

Au cours de ce travail sur des associés ectomycorhiziens, nous avons essayé d'évaluer l'intensité de la mycorhization par: le dosage de la glucosamine libérée par l'hydrolyse de la chitine fongique, le dosage par spectrophotométrie des pigments bruns extraits du *Pisolithus tinctorius* à l'aide d'acétone. Nous avons recherché si les corrélations entre ces deux mesures, et le comptage des ectomycorhizes étaient satisfaisantes.

Matériel et méthodes

Matériel végétal

Les méthodes d'hydrolyse, alcaline et acide, ont été mises au point: sur de la chitine pure (Sigma N° C 3641), sur des mycéliums de Pisolithe *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker et Couch. cultivés *in vitro* pendant 1 mois sur solution de Melin-Norkrans modifiée Marx (9), sur des racines non mycorhizées de pins maritimes (*Pinus pinaster* Soland. *in* Ait.) âgés de 4 à 5 mois. Les plantes ont été cultivées en conditions gnotobiotiques sur un mélange (*v*/*v*) de sable siliceux et de vermiculite, sur un mélange des deux végétaux (racines non mycorhizées de pin et thalles de Pisolithe).

Mycorhization contrôlée

La mycorhization des jeunes pins obtenus dans les mêmes conditions (paragraphe précédent) est effectuée en sachet d'après la méthode de Fortin *et al.* (3) légèrement modifiée: plante non axénique, solution nutritive remplacée par de l'eau distillée (ce qui supprime pratiquement les possibilités d'infections indésirables), introduction simultanée dans le sachet du pin et des implants mycéliens. Les plants, témoins ou inoculés sont maintenus à l'obscurité à 28°C pendant 24 h, et transférés ensuite en chambre climatisée (température de jour 25°C; température de nuit 22°C; énergie lumineuse, 40 000 $erg \cdot cm^{-2} \cdot s^{-1}$ (1 erg = 0,1 μJ)). Le séjour préalable à l'obscurité et à température élevée favorise le développement initial du mycelium. Huit jours après l'inoculation, les premières mycorhizes apparaissent; elles sont utilisées pour les expériences après 2 semaines.

Hydrolyse de la chitine

L'hydrolyse alcaline (1 mL NaOH 10 *N* pour 100 mg de mycélium sec ou 10 mg de chitine pure) est faite sous atmosphère d'argon dans un tube fermé hermétiquement pendant 6 h à 115°C (8). Le chitosane insoluble, résultant de

l'hydrolyse, est lavé suivant la méthode décrite par Ride et Drysdale (11): elle comporte cinq lavages successifs séparés par des centrifugations de 1500*g* pendant 10 min avec élimination des surnageants. Ces lavages sont effectués dans l'éthanol 75%, l'éthanol 40% puis trois fois avec de l'eau distillée.

L'hydrolyse acide (5 mL HCl 6 *N* pour 100 mg de mycelium sec ou 6 mg de chitine purifiée, 16 h à 80°C) est effectuée selon la technique préconisée par Swift (13). Cette hydrolyse produit directement des résidus glucosamine.

Colorimétrie

Les deux produits de l'hydrolyse, chitosane ou glucosamine, sont dosés par la réaction colorimétrique de Tsuji *et al.* (14). Celle-ci, spécifique de la glucosamine, donne une absorbance linéaire entre 0 et 30 $\mu g \cdot mL^{-1}$ de glucosamine avec un coefficient d'extinction moléculaire ϵm 3187 × 10^4. Nous avons adapté les conditions d'application des dosages, après hydrolyse acide, en provoquant la rétrogradation de l'excès de protons de l'hydrolysat par addition de 2,5 mL d'acétate de sodium 1,25 *M* à 0,5 mL d'hydrolysat (10).

Dénombrement des mycorhizes

Le pisolithe forme avec le pin maritime des ectomycorhizes typiques de couleur cannelle, dichotomes ou coralloïdes. Pour estimer le degré de mycorhization nous avons compté le nombre de racines courtes mycorhizées de chaque système racinaire.

Dosage des pigments fongiques

Pisolithus tinctorius contient des pigments qui diffusent dans le milieu de culture et l'addition d'acétone sur le mycelium frais provoque immédiatement leur diffusion. Chaque système racinaire, inoculé ou non, est traité par 3 mL d'acétone et la mesure d'absorbance de l'extrait acétonique peut être un moyen d'évaluer la masse de mycelium des mycorhizes. Le spectre d'absorption de cet extrait passe par un léger maximum pour une longueur d'onde de 432 nm; à cette même longueur d'onde un extrait acétonique de racines de pins non mycorhizés a une absorbance négligeable (fig. 1).

Résultats et discussion

Comparaison des deux méthodes d'hydrolyse

L'hydrolyse acide est plus complète que l'hydrolyse alcaline: sur la chitine purifiée les rendements des deux méthodes sont respectivement de 90 et 48%; la quantité moyenne de glucosamine fournie par 1 mg de matière sèche de pisolithe est de 72 ± 4,0 μg avec la première méthode et de 42,4 ± 2,44 μg avec la seconde. Pour la chitine purifiée, comme pour la chitine contenue dans le mycelium, les rapports de rendements en glucosamine des deux méthodes sont identiques, de l'ordre de 50 à 60%.

La comparaison des deux modes d'hydrolyse a été faite également sur des racines non mycorhizées de pin maritime; les absorbances des hydrolysats alcalins et acides sont respectivement de 0,012 et 0,165 pour 1 mg de matière sèche. Si la réaction colorée est due effectivement à des sucres aminés, les quantités correspondantes de glucosamine seraient de 0,21 et de 5,0 μg.

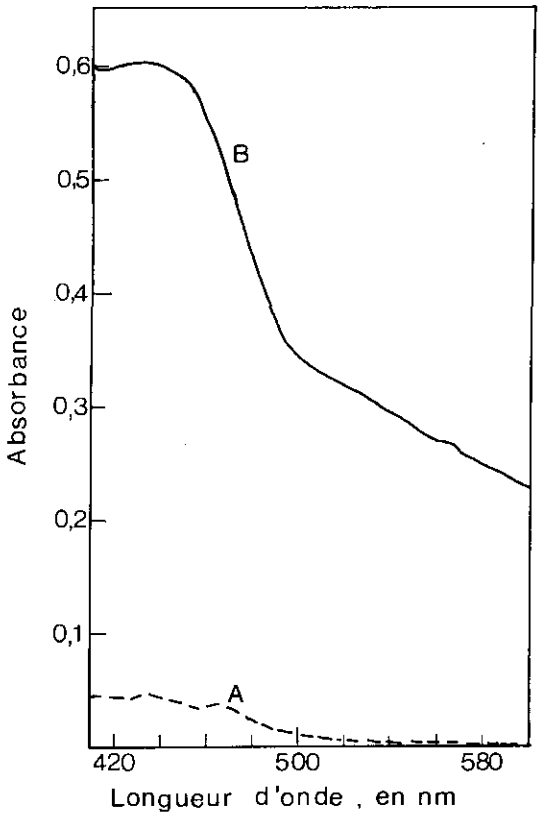

FIG. 1. Spectre d'absorption d'une solution d'acétone provenant d'un système racinaire de pin maritime non mycorhizé (A) et de mycelium (3 mg de poids frais) de pisolithe (B).

Dosage de la chitine purifiée ou fongique, hydrolysée en présence de racines de pins

Pour que la mesure de l'intensité de mycorhization par dosage de la chitine fongique soit possible, il faut s'assurer qu'il n'y a pas d'interaction entre les produits de l'hydrolyse des tissus végétaux et ceux de l'hydrolyse de la chitine.

Dosage de la chitine après hydrolyse alcaline

Nous avons soumis à l'hydrolyse alcaline des échantillons constitués par: des racines de pins non mycorhizés (environ 50 mg de matière sèche par échantillon), de la chitine pure (1 mg environ par échantillon), un mélange de chitine (1 mg) et des racines de pins (50 mg de matière sèche).

Les quantités de glucosamine données par le dosage colorimétrique effectué sur les résidus d'hydrolyse des racines sont très faibles (de l'ordre de 0,20 μg/mg de matière sèche) par rapport aux quantités fournies par la chitine pure (tableau 1).

L'analyse de variance des résultats indique que les valeurs obtenues sur de la chitine pure ne sont pas significativement différentes de celles obtenues avec le mélange de chitine et de racines. Nous en concluons que

TABLEAU 1. Dosage de glucosamine sur les résidus d'hydrolyse alcaline (chitine pure, tissus végétaux, mélange de chitine et de tissus)

	Taille de l'échantillon	Poids moyen de chitine pure (mg)	Poids sec moyen de racines (mg)	Poids sec moyen de mycelium (mg)	Quantité moyenne de glucosamine (μg/échantillon ± IC 5%)	Quantité moyenne de glucosamine (μg/mg matière sèche)
Racines seules						
Échantillon 1	8		50,0		10,5±6,0	0,21±0,12
Échantillon 2	11		30,0		6,3±3,0	0,20±0,1
Chitine pure	8	0,97			400±49,5	
Chitine pure		0,86				
Chitine et racines	8				375±42,0	
Racines (échantillon 1)			50,0			
Mycélium seul	11			3,0	127±32,7	42,4±10,9
Mycélium seul				2,9		
Mycélium et racines	11				119±17,7	
Racines (échantillon 2)			30,0			
Racines témoins	11		43,0		17,9	0,44±0,17
Racines mycorhizées	13		23,0	0,85*	36,0	

NOTE: IC 5%: intervalle de confiance au seuil de 5%.

*Le poids sec moyen de mycelium est estimé par le dosage de la chitine: 1 mg de matière sèche de *P. tinctorius* donne en moyenne 42,4 μg de glucosamine; connaissant la quantité de glucosamine fournie par les mycorhizes on en déduit la masse du mycelium dans celles-ci.

l'hydrolyse alcaline de mycorhizes permet de doser spécifiquement la glucosamine provenant de la chitine fongique sans que la mesure soit perturbée par des substances provenant des tissus de la plante supérieure. Ce résultat est confirmé par une expérience similaire faite avec des racines seules, du mycelium de pisolithe seul et un mélange des deux (tableau 1).

Nous avons soumis à l'hydrolyse alcaline les systèmes racinaires de 13 jeunes pins maritimes mycorhizés par le pisolithe et de 11 jeunes plants non mycorhizés. Un milligramme de matière sèche de racine non mycorhizée donne 0,44 μg de glucosamine, valeur qui ne diffère pas significativement de celles obtenues précedemment (tableau 1, 1re ligne). En admettant que la teneur en chitosane du mycelium en culture pure soit la même que celle de la mycorhize, nous pouvons estimer la masse moyenne (matière sèche) du tissu fongique dans la racine, en calculant le rapport: quantité de glucosamine de l'échantillon / quantité moyenne de glucosamine d'un milligramme de matière sèche de pisolithe hydrolysé seul (42,4 μg). L'estimation moyenne est alors de 0,85 mg de matière sèche de pisolithe par système racinaire mycorhizé (tableau 1).

Dosage de la chitine après hydrolyse acide

Des quantités croissantes de chitine pure (0,25–1,5 mg) ont été soumises à l'hydrolyse acide en présence ou en absence d'une masse constante (20 mg de matière sèche) de racines non mycorhizées de pins. Les pentes des droites de régression, entre les valeurs d'absorbance et les quantités de chitine, ne sont pas significativement différentes en présence ou en absence de racines: la proportionalité entre la quantité de glucosamine et la masse de chitine hydrolysée n'est donc pas modifiée par la présence des tissus de la plante phanérogame. Par contre l'ordonnée à l'origine est augmentée, ce qui confirme que les racines fournissent après hydrolyse acide des composés sensibles à la réaction colorée: pour une même masse de tissus ces composés augmentent l'absorbance mesurée d'une valeur constante.

Dans une autre expérience des échantillons de 20,50 et 80 mg de matière sèche de racines additionnés de 0,2 ou de 6 mg de matière sèche de mycelium (quatre répétitions par couple de traitement) sont soumis à l'hydrolyse acide. L'analyse de variance de cette expérience factorielle (12) confirme l'absence d'interaction entre les réponses dues aux tissus de pin et celles dues au mycelium; les deux valeurs d'absorbance sont additives: l'absorbance totale est donc une fonction linéaire de la masse de mycelium et de la masse de racines, soit:

$$[1] \quad Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2$$

où Y = absorbance à 653 nm, X_1 = poids de matière sèche de racines, X_2 = poids de matière sèche de mycelium.

Les données de l'expérience permettent de calculer les trois coefficients ce qui donne l'équation:

$$[2] \quad Y = 0{,}074 + 0{,}0038X_1 + 0{,}056X_2$$

Le coefficient a_0 représente la valeur d'absorbance lorsqu'il n'y a pas de substance végétale ($X_1 = X_2 = 0$): il ne devrait donc pas être significativement différent de zéro; or, il est du même ordre de grandeur que le coefficient a_2. Pour identifier l'origine de cette valeur élevée, nous avons soumis à l'hydrolyse acide des échantillons de racines de pins non mycorhizés dont le poids de matière sèche était compris entre 4 et 100 mg.

La figure 2A indique que l'absorbance n'est pas une fonction linéaire de la masse des racines. Une première droite de régression Y_1 passant pratiquement par l'origine

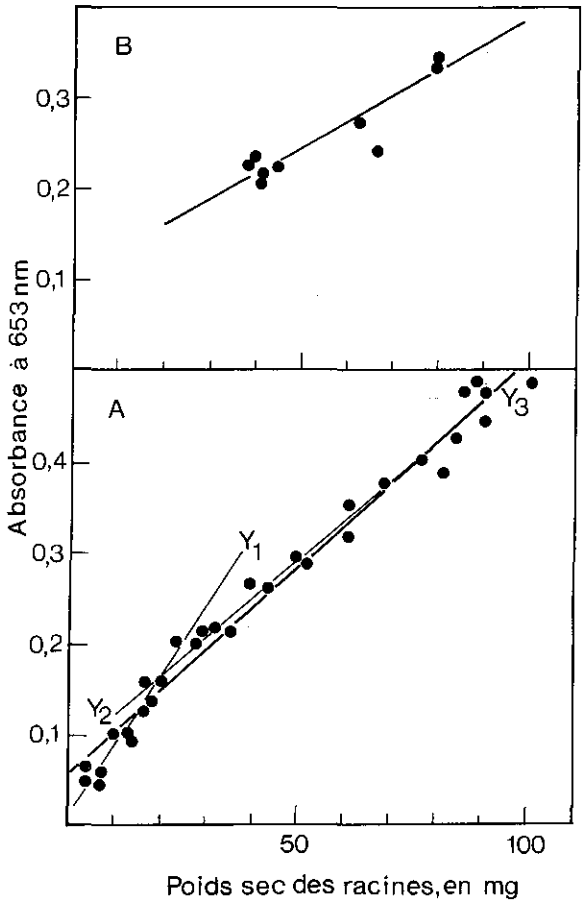

FIG. 2. Hydrolyse acide de racines non mycorhizées de pin maritime: relation entre l'absorbance à 653 nm et la quantité de matière sèche hydrolysée. (A) Échantillons dont les poids de matière sèche étaient compris entre 4 et 100 mg: $Y_1 = 0{,}015 + 0{,}0075x$, $r = 0{,}97$; $Y_2 = 0{,}085 + 0{,}0041x$, $r = 0{,}98$; $Y_3 = 0{,}055 + 0{,}0046x$, $r = 0{,}99$. (B) Racines témoins de l'échantillon mycorhizé: $y = 0{,}1 + 0{,}0028x$, $r = 0{,}98$.

TABLEAU 2. Comparaison des estimations moyennes de la masse mycélienne obtenues après hydrolyse alcaline ou acide d'échantillons de pins maritimes mycorhizés par pisolithe

	Hydrolyse alcaline		Hydrolyse acide	
Effectif de l'échantillon	13		15	
Nombre moyen de racines mycorhizées	19,5		31,4	
Quantité moyenne de pigments libérés mesurée par l'absorbance à 432 nm	0,43		0,72	
Absorbance moyenne à 432 nm/nombre moyen de mycorhizes	0,022		0,023	
Estimation moyenne de la masse mycélienne (mg matière sèche)	0,85	2,83*	1,5†	2,08‡
Masse moyenne de mycelium/nombre moyen de mycorhizes	0,044	0,09*	0,048†	0,066‡

NOTE: Pour calculer la masse de mycelium après hydrolyse acide nous avons utilisé les trois valeurs distinctes du coefficient a_0 fournies par les droites Y_1, Y_2, Y_3 de la figure 2A.
*a_0 = 0,015.
†a_0 = 0,085.
‡a_0 = 0,055.

(ordonnée à l'origine: 0,015) peut être calculée pour les poids inférieurs à 20 mg. Les points situés au-delà de cette valeur s'ajustent à une deuxième droite Y_2 dont l'ordonnée à l'origine (0,085) est du même ordre de grandeur que le coefficient a_0 calculé dans l'expérience précédente où les poids de matière sèche étaient comparables. Lorsque la droite de régression Y_3 est calculée sur l'ensemble des points expérimentaux de la figure 2A, le coefficient a_0 est égal à 0,055 et le coefficient de corrélation r est de 0,989.

L'existence du coefficient a_0 introduit une incertitude sur la valeur mesurée de l'absorbance. Néanmoins [1] permet de déterminer la masse X_2 du mycelium par la relation:

$$[3] \quad X_2 = \frac{(y - a_0) - a_1}{a_2 - a_1}$$

où $Z = X_1 + X_2$ représente le poids de matière sèche totale des mycorhizes. Nous avons attribué au coefficient a_0 les trois valeurs d'ordonnée à l'origine des droites Y_1, Y_2 et Y_3 de la figure 2A et nous les avons utilisées successivement pour estimer la masse de mycelium dans les racines mycorhizées de 15 jeunes plants de pins maritimes dont le poids Z varie de 13 à 35 mg de matière sèche.

Les trois valeurs de a_0 fournissent des estimations de la masse mycélienne, significativement différentes, mais qui restent du même ordre de grandeur (tableau 2). Les deux valeurs élevées de a_0 (0,085 et 0,055) donnent des estimations comparables à celle obtenue par le dosage spécifique du chitosane fongique (tableau 2). Pour un poids Z de matière sèche compris entre 13 et 35 mg, un coefficient a_0 élevé n'introduit qu'une incertitude minime sur l'estimation moyenne de X_2. Ces résultats indiquent en outre que la masse de mycelium est négligeable devant celle des racines. Nous pouvons donc confondre le poids des racines mycorhizées et le poids des racines seules.

L'absorbance Y' mesurée sur un hydrolysat de racines seules peut être déterminée expérimentalement sur des plants témoins, par une droite analogue à celle de la figure 2B. En admettant que la masse totale de la

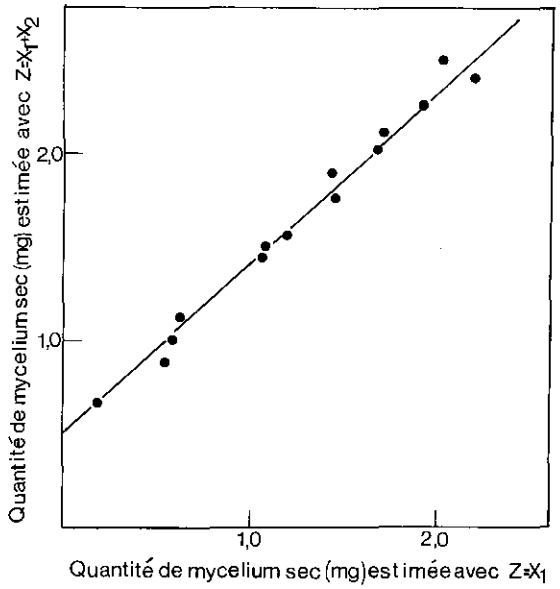

FIG. 3. Relation entre la masse mycélienne estimée après hydrolyse acide d'un échantillon de pins maritimes mycorhizés par pisolithe, soit en tenant compte de la masse mycélienne dans le poids total des échantillons ($Z = X_1 + X_2$), soit en confondant le poids total des échantillons avec le poids des racines ($Z = X_1$). $y = 0,49 + 0,93x$, $r = 0,99$.

mycorhize, Z, est pratiquement égale à la masse de matière sèche des racines seules, nous déduisons la part de l'absorbance due à la glucosamine fongique par la différence $\Delta Y = Y - Y'$ (Y', absorbance obtenue avec les échantillons de racines; Y, absorbance obtenue avec les échantillons de mycorhizes: voir [1]). La masse de mycelium X_2 est égale à: $\Delta Y/a_2$. Nous avons appliqué ce second mode d'estimation de la masse mycélienne aux résultats obtenus sur l'échantillon des 15 jeunes plants mycorhizés par pisolithe dont le poids Z varie entre 13 et 35 mg de matière sèche.

La corrélation entre ces deux estimations est de 0,99 et le coefficient de régression de 0,93 (fig. 3): malgré l'approximation ($Z = X_1$) l'estimation de la masse mycélienne X_2 est équivalente à celle obtenue en tenant compte de la somme des poids des tissus de champignon et de racines.

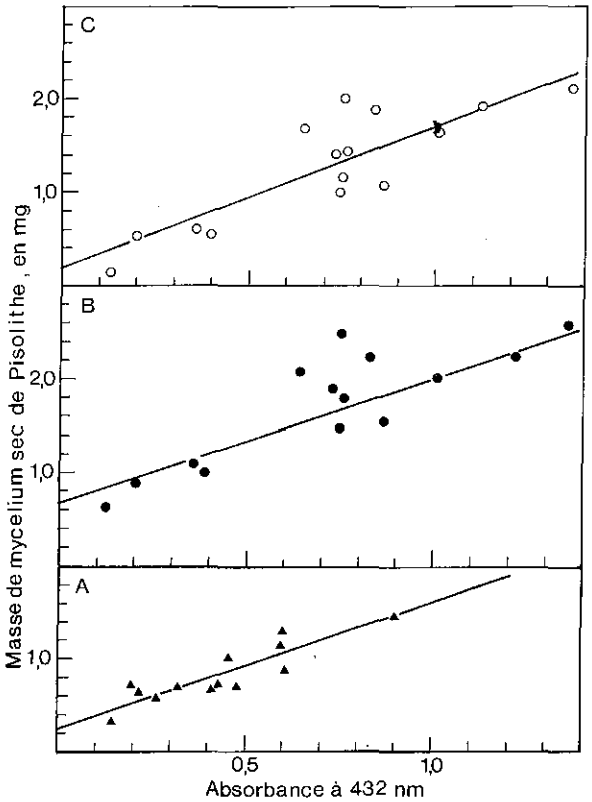

FIG. 4. Régression linéaire et corrélation entre l'estimation de la masse mycélienne et la quantité de pigments des racines, donnée par mesure d'absorbance à 432 nm. (A) Masse mycélienne estimée après hydrolyse alcaline: $y = 0{,}247 + 1{,}38x$, $r = 0{,}89$. (B) Masse mycélienne estimée après hydrolyse acide, en tenant compte de la masse mycélienne dans le poids total des échantillons: $y = 0{,}69 + 1{,}39x$, $r = 0{,}83$. (C) Masse mycélienne estimée après hydrolyse acide, en confondant le poids total des échantillons avec le poids de racines: $y = 0{,}19 + 1{,}54x$, $r = 0{,}86$.

Estimation de l'intensité de la mycorhization: comparaison des méthodes

Sur deux échantillons de pins maritimes mycorhizés par pisolithe l'intensité de la mycorhization a été évaluée: par comptage des ectomycorhizes; par mesure de l'absorbance d'un extrait acétonique des pigments; par estimation de la masse mycélienne donnée par le dosage colorimétrique des résidus d'hydrolyse alcaline ou acide de la chitine fongique. Parallèlement, des racines de pins non mycorhizées étaient soumises à l'un ou l'autre des deux modes d'hydrolyse.

Après dénombrement des mycorhizes, les pigments du champignon ont été extraits par l'acétone. Après cette extraction et séchage à 80°C, les racines du premier échantillon ont subi une hydrolyse alcaline, les racines du second une hydrolyse acide. La quantité de pigments libérée par le mycélium des mycorhizes est fonction du nombre de ces mycorhizes. Malgré un coefficient de corrélation hautement significatif entre ces deux variables, la dispersion des résultats obtenus est grande: la mesure de la quantité de pigments ne constitue pas une évaluation du nombre précis de mycorhizes. Cependant le comptage des mycorhizes, variable discontinue, semble introduire une plus grande part d'imprécision dans l'évaluation de la mycorhization que l'absorbance due aux pigments: les corrélations hautement significatives établies entre l'absorbance à 432 nm et la masse mycélienne estimée par dosage de la chitine fongique (fig. 4) sont supérieures à celles établies entre le nombre de mycorhizes et la masse mycélienne des mêmes échantillons (fig. 5). Cependant les ajustements linéaires réalisés à partir de ces différentes données présentent statistiquement les mêmes coefficients de régression.

Nous pouvons donc en conclure: que les trois estimations de la masse mycélienne sont équivalentes et que les trois méthodes (comptage des mycorhizes, extraction de pigments, hydrolyse alcaline ou acide) sont équivalentes pour évaluer le degré de mycorhization.

Conclusion

La méthode de dosage de la chitine fongique que nous proposons pour évaluer l'intensité de la mycorhization n'a été utilisée que sur un matériel biologique particulier: racines de pins maritimes, mycorhizées en sachet de croissance. Il est nécessaire de s'assurer que la même technique peut être appliquée à des mycorhizes obtenues dans d'autres conditions expérimentales.

Cependant la chitine représente en moyenne 10% du poids sec du mycelium pour les basidiomycètes que nous avons étudiés, par exemple *Hebeloma cylindrosporum* Romagnesi, *Suillus luteus* (L. *ex.* Fr.) S. F. Gray et *Pisolithus tinctorius*; cette proportion diffère

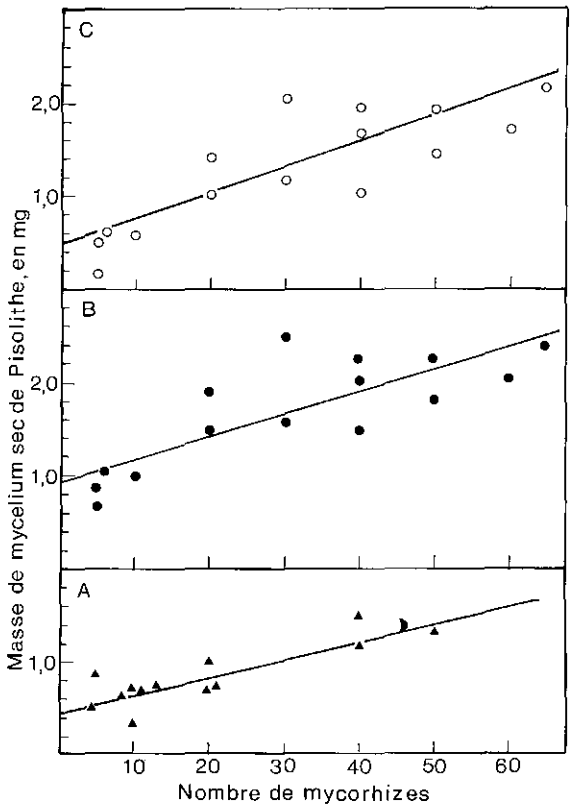

FIG. 5. Régression linéaire et corrélation entre l'estimation de la masse mycélienne et le nombre de mycorhizes. (A) Masse mycélienne estimée après hydrolyse alcaline: $y = 0{,}457 + 0{,}0208x$, $r = 0{,}85$. (B) Masse mycélienne estimée après hydrolyse acide, en tenant compte de la masse mycélienne dans le poids total des échantillons: $y = 0{,}962 + 0{,}0231x$, $r = 0{,}83$. (C) Masse mycélienne estimée après hydrolyse acide, en confondant le poids total des échantillons avec le poids des racines: $y = 0{,}49 + 0{,}0257x$, $r = 0{,}83$.

peu d'une espèce à l'autre. Par ailleurs nous avons constaté que la masse de chitine, mesurée au cours du développement d'un basidiomycète (*Suillus luteus*) sur solution nutritive, augmentait parallèlement à celle de la matière sèche (10), ce qui traduit un taux de chitine sensiblement constant. Celui-ci peut varier en fonction des conditions de culture: par exemple il est plus élevé en nutrition ammoniacale qu'en nutrition nitrique pure (10); ces différences, bien que significatives, ne modifient pas l'ordre de grandeur des teneurs en chitine. Compte tenu de ces observations nous pensons que le dosage de la chitine doit fournir une estimation convenable de l'intensité de mycorhization dans la plupart des conditions expérimentales.

Les corrélations positives que nous avons constatées entre les différentes méthodes d'évaluation, et entre ces méthodes et le dénombrement des racines courtes mycorhizées est un argument en faveur de la validité des méthodes proposées. Celles-ci permettent donc d'éviter le comptage direct, long, relativement imprécis, et qui n'est d'ailleurs pas toujours possible.

L'extraction par l'acétone et la mesure d'absorbance des pigments provenant du pisolithe est une méthode d'évaluation globale de la mycorhization. Toutefois la teneur en pigments du champignon peut varier en fonction de son âge ou du type de nutrition, azotée en particulier. D'autre part elle est limitée à l'étude des associations formées par le pisolithe ou par d'autres champignons pigmentés.

L'hydrolyse alcaline donne directement la quantité réelle de glucosamine due à la chitine fongique. Cependant elle nécessite de nombreuses manipulations qui entraînent des risques de sous-estimation par perte de matériel mycélien.

L'hydrolyse acide est beaucoup plus simple mais elle n'est pas spécifique de la chitine fongique. L'estimation de la réponse due au champignon introduit une erreur dans la quantification de la masse mycélienne des racines mycorhizées. Nous avons montré, en comparant les différentes méthodes, que cette erreur reste minime. L'hydrolyse acide nous paraît donc être une méthode commode et rapide pour estimer le degré de mycorhization. Un dosage plus spécifique des résidus glucosamine, tel que l'analyse de la composition des hydrolysats par chromatographie liquide à haute performance supprimerait les inconvénients qui résultent de l'utilisation de la réaction colorée.

1. BECKER, W. N., et J. W. GERDEMANN. 1977. Colorimetric quantification of vesicular–arbuscular mycorrhizal infection in Onion. New Phytol. **78**: 289–295.
2. BIERMANN, B., et R. G. LINDERMAN. 1981. Quantifying vesicular–arbuscular mycorrhizae: a proposed method towards standardization. New Phytol. **87**: 63–67.
3. FORTIN, J. A., Y. PICHÉ et M. LALONDE. 1980. Technique for the observation of early morphological changes during ectomycorrhiza formation. Can. J. Bot. **58**: 361–365.
4. GIOVANNETTI, M., et B. MOSSE. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular–arbuscular mycorrhizal infection in roots. New Phytol. **84**: 489–500.
5. HASELWANDTER, K. 1979. Mycorrhizal status of ericaceous plants in alpine and subalpine areas. New Phytol. **83**: 427–431.
6. HATCH, A. B. 1937. The physical basis of mycotrophy in the genus *Pinus*. Black Rock For. Bull. **6**: 1–168.
7. HEPPER, C. H. 1977. A colorimetric method for estimating vesicular–arbuscular mycorrhizal infection in roots. Soil Biol. Biochem. **9**: 15–18.
8. HORTON, D., et D. R. LINEBACK. 1965. *N*-deacetylation: chitosan from chitin. *In* Methods in carbohydrate chemistry. Vol. 5. *Edited by* R. L. Whistler. Academic Press, New York. pp. 403–406.
9. MARX, D. H. 1969. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic

infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. Phytopathology, **59**: 549–558.

10. PLASSARD, C. S., D. G. MOUSAIN et L. E. SALSAC. 1982. Estimation of mycelial growth of basidiomycetes by means of chitin determination. Phytochemistry, **21**(2): 345–348.
11. RIDE, J. P., et R. B. DRYSDALE. 1972. A rapid method for the chemical estimation of filamentous fungi in plant tissue. Physiol. Plant Pathol. **2**: 7–15.
12. SNEDECOR, G. W., et W. G. COCHRAN. 1957. Méthodes statistiques. 6e édition. l'Association de Coordination Technique Agricole, Paris.
13. SWIFT, M. J. 1973. The estimation of mycelial biomass by determination of the hexosamine content of wood tissue decayed by fungi. Soil Biol. Biochem. **5**: 321–332.
14. TSUJI, A., T. KINOSHITA et M. HOSHINO. 1969. Analytical chemical studies on amino sugars. II. Determination of hexosamines using 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone hydrochloride. Chem. Pharm. Bull. **17**(7): 1505–1510.